DOI: 10.5846/stxb201604010598

李建宏,李雪萍,卢虎,姚拓,王理德,郭春秀,师尚礼.高寒地区不同退化草地植被特性和土壤固氮菌群特性及其相关性.生态学报,2017,37(11):3647-3654.

Li J H, Li X P, Lu H, Yao T, Wang L D, Guo C X, Shi S L.Characteristics of, and the correlation between, vegetation and N-fixing soil bacteria in alpine grassland showing various degrees of degradation.Acta Ecologica Sinica,2017,37(11):3647-3654.

高寒地区不同退化草地植被特性和土壤固氮菌群特性及其相关性

李建宏[1,2],李雪萍[1,2],卢　虎[1,3],姚　拓[1,2,*],王理德[1,2],郭春秀[1,2],师尚礼[1,2]

1 甘肃农业大学草业学院, 兰州　730070

2 草业生态系统教育部重点实验室, 兰州　730070

3 深圳市芭田生态工程股份有限公司博士后研究中心,深圳　518105

摘要:选取东祁连山不同退化程度的高寒草地为研究对象,调查研究其植物种类、植被盖度、高度、地上生物量等植物指标以及土壤好气性自生固氮菌和嫌气性自生固氮菌数量,在此基础上,采用 real-time PCR 的方法扩增 *nifH* 基因,测定不同退化程度草地土壤中固氮菌相对于土壤总细菌的量,以探讨草地退化过程中植被及土壤固氮菌群的变化规律,结果发现:随着退化程度的加深,草地植物种类逐渐减少,并且优势植物发生变化,毒杂草逐渐增多,植被的高度、盖度、地上生物量都逐渐降低。对土壤固氮菌的研究则表明,土壤好气性自生固氮菌和嫌气性自生固氮菌的数量在不同退化草地随草地退化程度的加重而减少,在同一退化程度草地土壤则是随土层深度加深而下降。对土壤固氮菌 *nifH* 基因扩增的结果也表明随着退化加剧,土壤固氮菌相对于土壤总细菌的比例在降低,进一步说明草地退化过程中土壤固氮菌不仅是数量上的下降,更是群落结构层面的变化。对植被特性和土壤固氮菌含量的相关分析表明,植被特性和土壤中固氮菌含量呈显著相关。研究从土壤固氮菌群的角度研究了草地退化的过程,说明了二者具有协同性,研究和治理草地退化必须重视土壤功能菌群尤其是固氮菌群的作用。

关键词:高寒草地;草地退化;植被特性;固氮菌;*nifH* 基因

Characteristics of, and the correlation between, vegetation and N-fixing soil bacteria in alpine grassland showing various degrees of degradation

LI Jianhong[1,2], LI Xueping[1,2], LU Hu[1,3], YAO Tuo[1,2,*], WANG Lide[1,2], GUO Chunxiu[1,2], SHI Shangli[1,2]

1 *College of Prataculture, Gansu Agricultural University, Lanzhou* 730070, *China*

2 *Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Lanzhou* 730070, *China*

3 *Post-Doctorate Research Centre in Batian Eco-Engineering Co., Ltd, Shenzhen* 518105, *China*

Abstract: China has some of the most serious grassland degradation in the world, with about 90% of the available grassland being subject to various degrees of degradation. The grassland shows surface vegetation degradation, and there is a close relationship with soil degradation. Self N-fixing bacteria have an important impact on soil quality. In this study, alpine grasslands that had suffered different levels of degradation were selected as study areas in the east Chi-lien mountains. The plant species, coverage, average height, and above ground biomass were investigated, and the population of aerobic N-fixing bacteria and anaerobic N-fixing bacteria in the soil were measured. The levels of soil N-fixing bacteria relative to total soil bacteria were determined by the levels of real-time PCR-amplified *nifH* gene present in the different degraded

基金项目:国家自然科学基金项目(31360584);农业部国家牧草产业技术体系(CARS-35)

收稿日期:2016-04-01;　　**网络出版日期**:2017-02-22

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

grasslands. These methods showed how vegetation and soil N-fixing bacteria changed and how these changes were regulated as the degradation process progressed. The results showed that plant species abundance decreased; the dominant species varied; poisonous weed numbers gradually increased; and the height, coverage, and above ground biomass of the vegetation all decreased as the degradation process progressed. The lightly degraded grassland had up to 20 species, whereas there were only 11 in the severely degraded grassland. At first, there was only one dominant species, *Elymus nutans*, but this gradually evolved into two species, *Elymus nutans* and *Potentilla chinensis*, as degradation progressed. The poisonous weeds that appeared included *Achnatherum inebrians* and *Stellera chamaejasme*. The medially degraded and severely degraded grassland ground biomass was lower by 47.2% and 92%, respectively, than that of the lightly degraded grassland, and the average height of the severely degraded grassland decreased by 42.3 cm. Vegetation coverage also showed similar trends. The population of aerobic self N-fixing bacteria and anaerobic N-fixing bacteria was affected by the degree of degradation and the soil depth. The further grassland degradation had progressed and the deeper the soil layer, the lower were the number of self N-fixing bacteria. The examination of genetically amplified *nifH* showed that the ratio of soil self N-fixing bacteria to total soil bacteria declined. In the surface soil, the proportion of the bacteria made up of self N-fixing bacteria in the medium degraded grassland was lower by 26.9% than that of the lightly degraded grassland. In the severely degraded grassland, the proportion of self N-fixing bacteria was lower by 13.2% than that in the relatively medially degraded grassland, and the proportions were similar across all soil layers. This showed that the population of soil self N-fixing reduced, and that there was a degradation of community structure. The correlation analysis indicated a significant correlation between the vegetation characteristics and the population of soil self N-fixing bacteria. In summary, grassland degradation gradually reduced ground vegetation height, coverage, and aboveground biomass, and increased the numbers of poisonous weeds. It also reduced the numbers of soil self N-fixing bacteria numbers and had negative effects on soil microbial community structure. This jndicates a correlation between the grassland degradation process and soil self N-fixing bacteria. These results show that the soil functional flora, especially the role of soil self N-fixing bacteria, must be considered when researching and managing grassland degradation.

Key Words: alpine grassland; grassland degradation; vegetation characteristics; N-fixing bacteria; *nifH* gene

草地生态系统是陆地上最重要的生态系统,具有防风、固沙、保土、调节气候、净化空气和涵养水源等生态功能,对于地球生物圈的稳定与平衡和人类社会可持续发展具有重要意义。我国是世界第二大草原国家,草地资源在国土资源中占据相当重要的地位,具有极其重要的生态价值、经济价值和社会价值[1]。但是,近年来,随着居民生活水平的提高以及对肉、奶等畜产品和草原旅游文化需求的不断提升,人类对草地资源进行过度开发和利用,草地生态系统的平衡遭遇严重破坏。目前,我国已成为世界上草原退化最严重的国家,90%的可利用草原都出现了不同程度的退化[2]。草地退化的同时也引发了一系列严重问题,包括地上植物群落物种组成和比例发生变化,牧草品质和产量下降,草畜矛盾突出,草地碳储量降低,温室气体排放增加,物种多样性失衡和减少,灾害天气频发等,草地退化已经成为影响我国草地生态、经济稳步发展的限制因子。

近些年,随着研究和实践的深入,越来越多的研究者和管理者认识到草地退化不仅是地表植被的退化,更与土壤退化具有密切联系。植被退化是草原土壤退化的直接原因,而土壤退化也必然引起植被退化,二者互为因果。侯扶江、南志标等[3]认为草地退化过程不但是植被和土壤层面的退化,更是这两个系统耦合关系的丧失和系统相悖所导致的。笔者课题组在研究高寒草地退化机理时发现,伴随着草地植被退化,草地土壤的微生物群落结构等都发生了显著的变化[4-5]。

事实上,在草原生态系统中,土壤微生物的活性直接影响着土壤肥力,进而控制着土壤健康状况和草地植物生长发育。同时,土壤微生物受土壤环境和生物多样性的影响,并随草地健康状况变化而改变,揭示和指示草地生态系统现状和发展趋势。固氮菌是土壤中一类重要的功能微生物,在土壤氮素循环中发挥着无可替代

的作用,对于土壤系统乃至整个生态系统的健康有序发展具有极其重要的意义[6-7]。因此,土壤固氮菌是衡量土壤质量的重要指标,但目前有关草地退化对土壤固氮菌群落影响的研究还未见报道。本研究选取不同退化程度的高寒草地为研究对象,探讨土壤固氮菌群特性与草地植被特性之间的关系,以期从功能微生物的角度分析草地退化机理,为高寒草地生态系统的保育及恢复工程提供理论依据和科技支撑。

1　材料与方法

1.1　研究区自然概况

研究区位于甘肃省武威市天祝藏族自治县抓喜秀龙沟甘肃农业大学高山草原试验站(坐标为 37°11′—37°13N′,102°29′—102°33′E),海拔为 2960—2990 m,气候寒冷潮湿,年均温-0.1℃,>0℃年积温 1380℃,水热同期,年平均降水量 416 mm,多为地形雨,集中于 7—9 月,年蒸发量 1592 mm。年日照时数 2600 h;无绝对无霜期,仅分冷、热 2 季。植被以早熟禾(*Poa*)、嵩草(*Kobresia bellardii*)、苔草(*Carex*)、针茅(*Stipa capillata*)、金露梅(*Potentilla fruticosa*)、珠芽蓼(*Polygonum viviparum*)、棘豆(*Oxytropis*)、委陵菜(*Potentilla chinensis*)、甘肃马先蒿(*Pedicularis kansuensis*)等为主。土壤以亚高山黑钙土、亚高山草甸土为主,有机质含量 10%—16%,水分含量 40%—80%,全磷含量 0.056%-—0.071%,全氮含量 0.5%—0.8%,pH 为 7.0—8.2[4]。

1.2　样地植物特性调查

以《天然草地退化、沙化、盐渍化的分级标准》(GB19377—2003)[8]为依据,在综合考虑植被、土壤等各因子的基础上,将研究区内草地划分为重度退化、中度退化、轻度退化 3 个退化等级(表 1),在每种退化程度草地上随机选取 3 个的样方,调查并准确记录每个样方内的植物种类、盖度、高度等指标。植被盖度采用针刺法测量,高度采用样方内群落自然高度的平均值[9]。

表 1　样地概况

Table 1　General condition of sample plot

编号 NO.	样地名称 Name of sample plot	地点 Location	特点 Characteristics
SDG	重度退化草地	天祝县抓喜秀龙乡	放牧压力大,践踏严重,植被啃食严重,植被低矮
MDG	中度退化草地	甘肃农业大学高山草原站	有围栏保护,但放牧强度较大,植被生长较弱
LDG	轻度退化草地	国家级草原固定检测站	有围栏保护(5 年),植被生长良好

SDG: 重度退化草地 severe degraded grassland;MDG: 中度退化草地 moderate degraded grassland;LDG: 轻度退化草地 light degraded grassland

1.3　样品采集

采样时间为 2015 年 7 月,刈割 1.2 所述样方内植物的地上部分,除去杂质后封装。然后分 0—10、10—20 cm 和 20—30 cm 3 个深度分别采集样方内土壤样品,装入无菌容器密封后低温运输至实验室进行测定。

1.4　土壤固氮菌的测定

1.4.1　好气性自生固氮菌的测定

采用改良阿须贝(Ashby)无氮培养基,平板涂布法测定好气性自生固氮菌[10]。阿须贝无氮培养基配方为:葡萄糖 10 g、K_2HPO_4 0.2 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、K_2SO_4 0.2 g、NaCl 0.2 g、$CaCO_3$ 5 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1000 mL。

1.4.2　嫌气性自生固氮菌的测定

采用玉米面培养基,平板涂布法测定嫌气性自生固氮菌[10]。培养基配方为:玉米面 5 g、$CaCO_3$ 0.5 g、自来水 1000 mL。

1.5　土壤固氮菌 *nifH* 基因的测定

采用 real-time PCR 方法测定土壤中固氮菌的含量相对于土壤总细菌的量,以百分比表示[11]。

1.5.1　基因组 DNA 的提取及检测

土壤总 DNA 的提取采用 OMEGA Soil DNA isolation kit(OMEGA, USA),步骤参照说明书。Total DNA 质

量及浓度检测使用紫外分光光度计(Beckman DU 640,USA)法测定。

1.5.2 Real-time PCR 引物

土壤总细菌 16S rRNA 基因片段扩增采用的引物是 341F (5′- CCTACGGGAGGCAGCAG-3′)和 518R (5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′)[12]。固氮菌 *nifH* 基因扩增所采用的引物是的 Pol F (5′-TGCGAYCCSAARGCBGACTC -3′) 和 Pol R(5′-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3′)[13]。引物由上海派森诺生物科技有限公司合成。

1.5.3 Real-time PCR 程序

用 SYBR Premix Ex TaqTM(TaKaRa Shuzo,Osaka,Japan)建立反应体系,具体为:DNA 模板 2 μL、上游和下游引物各 0.5 μL、SYBR Green I 荧光染料预混试剂 10 μL、ddH_2O 12 μL。

扩增条件为:95℃预变性 30 sec,95 ℃变性 5 sec,60℃退火和延伸 20 sec 并采集荧光信号,45 次循环。

1.5.4 Real-time PCR 数据分析

根据以下公式计算土壤中固氮菌的含量相对于土壤总细菌的量:

目标菌(%总菌 16S rDNA)= $2^{-(\text{Ct target} - \text{Ct total bacteria})} \times 100$,Ct target 为目标菌引物所测 Ct 值,Ct total bacteria 为以总细菌为引物所得的 Ct 值[11]。

1.6 数据分析

采用 Excel 2007 整理数据,DPS v 7.65 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同退化草地植被特征

2.1.1 植物种类

如表 2 所示,草地退化程度对植物种类有强烈的影响,退化程度越严重,植物种数越少,轻度退化草地有高达 20 种植物,而重度退化草地仅有 11 种。另外,由表还可以发现,随着退化程度的加剧,草地上出现了醉马草、狼毒等毒杂草,这些毒杂草的出现也是草地质量变差、生产力下降的标志。就优势种来看,无论哪种退化程度,披碱草都是主要优势种之一。而随着退化程度加深,可以发现,委陵菜逐渐成为了优势种。

表 2 草地植物种类

Table 2 Species of vegetation

样地编号 No.	植物种数 Number of species	植物种类 Species	优势种 Dominant species
SDG	11	披碱草 *Elymus nutans*,委陵菜 *Potentilla chinensis*,扁蓿豆 *Melissilus ruthenicus*,棘豆 *Oxytropis* spp.,狼毒 *Stellera chamaejasme*,蒲公英 *Taraxacum mongolicum*,苦苦菜 *Herba Taraxaci*,马蔺 *Iris lactea* var. chinensis,臭蒿 *Artemisia hedinii*,醉马草 *Achnatherum inebrians* 车前 *Plantago asiatica*	披碱草 *Elymus nutans*,委陵菜 *Potentilla chinensis*
MDG	17	披碱草 *Elymus nutans*,委陵菜 *Potentilla chinensis*,扁蓿豆 *Melissilus ruthenicus*,早熟禾 *Poa annua*,珠芽蓼 *Polygonum viviparum*,棘豆 *Oxytropis* spp.,狼毒 *Stellera chamaejasme*,嵩草 *Kobresia bellardii*,小大黄 *Rheum pumilum*,蒲公英 *Taraxacum mongolicum*,苦苦菜 *Herba Taraxaci*,毛茛 *Ranunculus japonicus*,马蔺 *Iris lactea* var. chinensis,臭蒿 *Artemisia hedinii*,醉马草 *Achnatherum inebrians*,野草莓 *Fragaria vesca*,车前 *Plantago asiatica*	披碱草 *Elymus nutans*,委陵菜 *Potentilla chinensis*
LDG	20	披碱草 *Elymus nutans*,扁蓿豆 *Melissilus ruthenicus*,早熟禾 *Poa annua*,珠芽蓼 *Polygonum viviparum*,委陵菜 *Potentilla chinensis*,棘豆 *Oxytropis* spp.,火绒草 *Leontopodium leontopodioides*,嵩草 *Kobresia bellardii*,野韭菜 *Allium japonicurn*,麻花艽 *Gentiana straminea*,小大黄 *Rheum pumilum*,扫帚草 *Kochia scoparia*,蒲公英 *Taraxacum mongolicum*,苦苦菜 *Herba Taraxaci*,毛茛 *Ranunculus japonicus*,马蔺 *Iris lactea* var. chinensis,臭蒿 *Artemisia hedinii*,野草莓 *Fragaria vesca*,苔草 *Carex spp.*,针茅 *Stipa capillata*	披碱草 *Elymus nutans*,扁蓿豆 *Melissilus ruthenicus*,早熟禾 *Poa annua*

2.1.2 植物群落高度和盖度

植物群落是特定环境下各植物种群在长期的演替过程中通过复杂的种间关系而形成的具有特定结构的

集合体,是反应环境条件的重要指标。如表 3,随着退化的加深,植物的高度逐渐降低,在重度退化的草地上,平均高度仅有 1.8 cm,植物贴伏地面生长,而轻度退化的草地则高达 44.1 cm,差异十分明显。植被的盖度也呈现相似规律,但随退化的加剧下降幅度较低。研究结果反应草地退化对植物群落从垂直结构和水平结构两个层面都有明显的影响,垂直结构层面的影响更为剧烈。

表 3　不同退化草地植被特征

Table 3　Vegetation characteristic of varied degraded grasslands

样地编号 No.	平均高度 Average height /cm	平均盖度 Average coverage/%	平均地上生物量 Average aboveground biomass /(g/m^2)
SDG	1.8a	71a	15.15a
MDG	23.5b	85b	95.81b
LDG	44.1c	97c	181.32c

同列不同字母表示差异显著(P < 0.05)

2.1.3　草地地上生物量

地上生物量是反应草地农业生态系统生产力的最重要、最直观的指标。如表 3,与群落高度和盖度两个指标相似,随退化的加剧,草地的地上生物量急剧下降,草地地上生物量与群落高度及盖度变化一致,随退化程度的加深而数量递减。与轻度退化草地相比,中度退化的草地地上生物量下降了 47.2%,而重度退化草地则高达 92%。

2.2　不同退化草地土壤固氮菌组成

2.2.1　好气固氮菌

如图 1 所示,在同退化程度草地,不同土层中好气性自生固氮菌的数量不同,土层越深,好气固氮菌的数量越少,如轻度退化草地,0—10 cm 土层好气固氮菌的数量达 9.25×10^4 cfu/g,而 10—20 cm 土层的土壤则减少为 5.84×10^4 cfu/g,20—30cm 土层则更少,仅为 3.21×10^4 cfu/g,其他各退化程度草地土壤也呈相似规律。好气性自生固氮菌的生长需要氧气,而土层越深,土壤中的含氧量越低,因而好气性自生固氮菌的生长受到抑制。就同一土层不同退化程度来看,退化程度越重,土壤中好气性自生固氮菌的数量就越低。以 0—10cm 土层土壤为例,轻度退化草地 0—10 cm 土层好气固氮菌的数量达 9.25×10^4 cfu/g,而中度退化草地的土壤则减少为 6.26×10^4 cfu/g,重度退化草地土壤中则更少,仅为 2.75×10^4 cfu/g,其他各土层也呈相似规律。

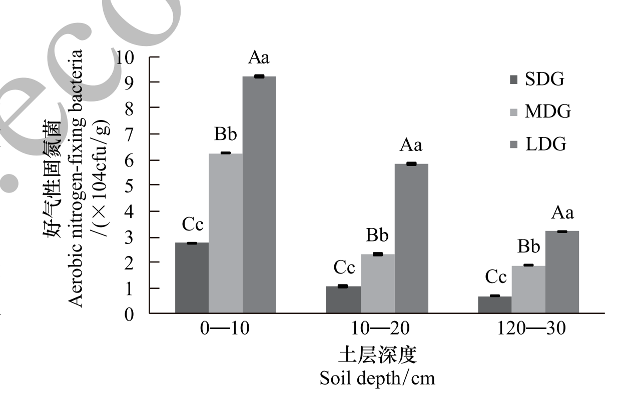


图 1　不同退化草地好气自生固氮菌数量变化动态

Fig.1　Different degraded grassland aerobic nitrogen-fixing bacteria quantity change dynamically

同列不同字母表示差异显著(P < 0.05),“SDG”、“MDG”和“LDG”分别代表“重度退化草地”、“中度退化草地”和“轻度退化草地”

2.2.2　嫌气固氮菌

如图 2 所示,同一退化程度草地,不同土层土壤中嫌气性固氮菌的数量不同,基本都呈现土层越深,数量越少的规律,但随土层加深而减少的幅度比好气性自生固氮菌低,以轻度退化草地为例,0—10 cm 土层土壤中为 3.59×10^4 cfu/g,20—30 cm 土层为 3.22×10^4 cfu/g,而 20—30 cm 土层则减少为 2.66×10^4 cfu/g,其他各退化程度草地都呈这一趋势。而不同退化程度草地同一土层中的嫌气性固氮菌数量不同,以 0—10 cm 土层为例,轻度退化草地土壤中嫌气性自生固氮菌数量为 3.59×10^4 cfu/g,中度退化草地为 1.41×10^4 cfu/g,而重度退化草地仅为 0.56×10^4 cfu/g。由此可见,随着退化的发生,植被的退化和好气性固氮菌、嫌气性固氮菌数量的减少是一个统一的过程。

2.3 草地退化对土壤固氮菌 *nifH* 的影响

从基因的层面研究草地退化过程中固氮菌的变化，得到的结果与纯培养法得到的结果类似，都是随着退化程度的增大而减少，固氮菌是土壤中的重要功能菌，对于土壤中的氮素循环具有重要作用，图 3 的结果显示了草地退化过程中土壤中固氮菌相对于土壤总细菌的比例在降低，如 0—10 cm 的土壤中，中度退化草地固氮菌的比例相对于轻度退化草地固氮菌的比例下降了 26.9%，而重度退化草地又较中度退化草地下降了13.2%，因此，土壤中固氮菌的含量受草地退化程度的影响十分显著。另外，还可以发现，土壤中固氮菌的分布是随土层深度的加深而减少的，各退化程度草地都呈同样规律，好气性自生固氮菌和嫌气性自生固氮菌的纯培养实验结果也支持这一结论。

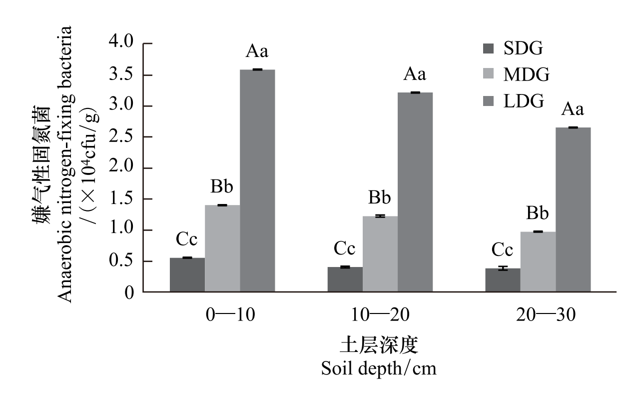


图 2 不同退化草地嫌气性自生固氮菌数量变化动态

Fig. 2 Different degraded grassland aerobic nitrogen-fixing bacteria quantity change dynamically

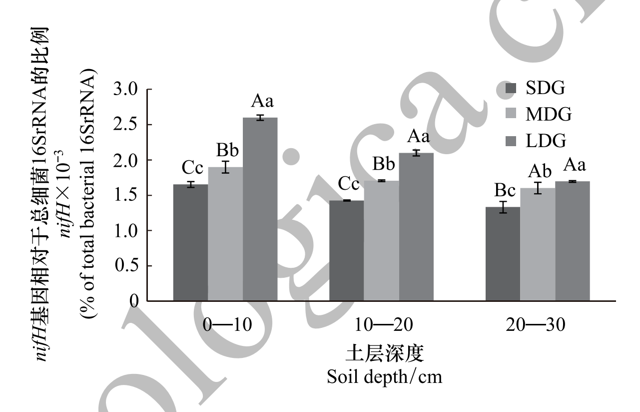


图 3 不同退化草地土壤固氮菌 *nifH* 的变化动态

Fig.3 different degraded grassland soil azotobacter *nifH* changes dynamically

2.4 草地退化过程植被与土壤固氮菌相关性分析

如表 4 所示，植被各特性之间存在显著的相关性，如盖度和高度，以及盖度、高度和地上生物量之间均为极显著正相关关系，说明草地退化过程并不是某一个层面上的退化，是多层面、全面的过程。而固氮菌群各指标之间也存在显著的相关性，这也证明了运用 *nifH* 基因丰度为研究土壤固氮菌群结构是准确合理的。另外，植被特性与固氮菌特性之间也具有相关性。说明了在草地生态系统中，植物和土壤中的功能微生物是息息相关的，也说明土壤固氮菌可以作为草地退化的监控和评价指标。

表 4 草地退化过程植被与土壤固氮菌相关性分析

Table 4 The deterioration process of vegetation and soil azotobacter correlation analysis

相关性系数 Correlation coefficient	物种数量 Number of species	高度 Height	盖度 Coverage	地上生物量 Aboveground biomass	好气性固氮菌 Aerobic nitrogen-fixing bacteria	嫌气性固氮菌 Anaerobic nitrogen-fixing bacteria	*nifH*
物种数量 Number of species	1	0.98 *	0.99 *	0.98 *	0.96 *	0.9	0.89
高度 Height		1	1.00 **	1.00 **	1.00 **	0.96 *	0.95 *
盖度 Coverage			1	1.00 **	0.99 **	0.96 *	0.95
地上生物量 Aboveground biomass				1	1.00 **	0.97 *	0.96 *
好气性固氮菌 Aerobic nitrogen-fixing bacteria					1	0.98 *	0.98 *
嫌气性固氮菌 Anaerobic nitrogen-fixing bacteria						1	1.00 **
nifH							1

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

3.1 土壤自生固氮菌和 *nifH* 基因

本研究发现土壤自生固氮菌和 *nifH* 基因的变化规律能很好的吻合,目前发现的土壤固氮菌不仅有自生固氮菌,还有共生固氮菌和联合固氮菌,分属于 59 个属,但它们都是原核生物[14]。所有的固氮菌都含有固氮酶,该酶由 *nifD* 和 *nifK* 基因编码的钼铁蛋白和由 *nifH* 基因编码的铁蛋白构成的[15],即所有的固氮菌都含有 *nifH* 基因,另一方面,*nifH* 基因也是长期进化过程中最古老的功能基因,其只存在于固氮微生物中[16],系统进化关系与 16S rDNA 相一致。因此,*nifH* 基因是研究固氮菌群落结构最好的标记基因,前人在此方面进行了大量的研究,众多的研究资料显示,在不同自然环境中的 *nifH* 基因呈现出差异性和多样性,固氮菌的群落结构也表现出明显的差异[17],本研究验证了 *nifH* 基因在研究高寒草地和草地退化方面具有优势,是草地退化的监控和研究工作中的有力工具。

3.2 土壤固氮菌与草地退化

土壤固氮菌是一种具有特殊功能的菌群,可以将空气中的 N_2 在固氮酶的作用下还原为植物可以吸收和利用的离子态氮,研究这类具有特殊功能的菌群有助于揭示功能微生物在草地植被演替中的作用,如氮循环等。本研究发现,在草地退化过程中,土壤好气性自生固氮菌、嫌气性自生固氮菌的数量都随退化程度的加深而下降,固氮菌 *nifH* 丰度也在显著下降。这表明草地退化对土壤固氮菌存在严重的抑制作用,且退化程度越高,抑制作用越大。谭红妍[18]、文都日乐[19]等研究了放牧对草地微生物的影响,结果都显示随放牧压力的增大,土壤固氮菌群数量在减少,这与本文的结论吻合。生物固氮的固氮量每年可达 200—300 kg/hm^2[20],对于没有额外人工氮素施入的天然草地来说,意义极为重大,可以说,生物固氮是草地农业可持续发展的基础。而退化却严重抑制了固氮菌的生长,直接危害是导致固氮量的下降,固氮量下降的直接结果是流入系统的氮素减少,植物生长进一步受到抑制,退化加重。草地的发展陷入恶性循环。因此,本研究提示我们,固氮菌不仅可以作为草地退化程度的指标,而且研究和治理草地退化也必须重视土壤功能菌群尤其是固氮菌群的作用。

3.3 草地退化过程中植被演替与土壤微生物

本研究对植被和土壤固氮菌群相关性分析的结果表明:草地植被的演替与土壤微生物菌群的变化具有显著相关的关系。草地退化最直观的表现就是天然植被的演替,而地表植物群落与土壤微生物群落多样性的关系是生态学研究中重要的方面[21]。有研究表明,肥沃程度较低的草原土壤微生物生物量高于肥沃程度较高的草原土壤,这一变化的实现是通过调控土壤中氮(N)元素的含量来完成的[22-23],在此过程中起直接作用的便是土壤固氮菌群。与此相应,土壤的微生物群落结构也同时发生了变化,肥沃程度较高的草原土壤中细菌含量高于肥沃程度低的土壤,而真菌含量低于肥沃程度低的土壤[24]。这些结果表明了土壤微生物的结构和群落数量与草原土壤基质的性质相关。Grayston 等[25]利用群落 DNA 技术、PLFA 技术和 CLPP 技术相结合的方法细致的分析探讨了温带草原生态系统土壤微生物群落的功能和结构,得到了相似的结论。但也有相反的例子,如 Chabrerie.[26]研究了法国西北部人工草原的土壤微生物和植物群落的关系,结果显示了微生物群落的变化并不依赖于植物群落的演替,微生物群落的趋异程度与土壤湿度、糖及可溶性碳的含量正相关,而与木质素的含量负相关,综合而言植被和环境因子表现出了复杂的相互关系。Kowalchuk 等[27]等的报道中也得到了相似的结论。因此,土壤微生物与草原植物群落的关系并不是简单的对应关系,而是一个非常复杂的关系。本研究结果初步显示了固氮菌群与植物群落的重要性,但其互作的机理,还需要进一步的研究。

4 结论

草地退化过程中,随着退化程度的加深,草地植物种类逐渐减少,并且优势植物发生变化,毒杂草逐渐增多,植被的高度、盖度、地上生物量都逐渐降低。对土壤固氮菌的研究则表明,土壤好气性固氮菌和嫌气性固氮菌的含量受到退化程度和土层深度的影响,退化程度越深,固氮菌含量越低,土层越深,固氮菌含量越低。

对土壤固氮菌 *nifH* 基因扩增的结果也表明随着退化加剧,土壤固氮菌相对于土壤总细菌的比例在降低,进一步说明草地退化过程中土壤固氮菌不仅是数量上的下降,更是群落结构层面的变化。对植被特性和土壤固氮菌含量的相关性分析表明,植被特性和固氮菌含量呈显著相关。因此,研究和治理草地退化就必须重视土壤功能菌群尤其是固氮菌群的作用。

参考文献(References):

[1] 方精云, 白永飞, 李凌浩, 蒋高明, 黄建辉, 黄振英, 张文浩, 高树琴. 我国草原牧区可持续发展的科学基础与实践. 科学通报, 2016, 61(2): 155-164.

[2] 张英俊. 草地退化原因及防治对策 // 2007 年年中国草学会青年工作委员会学术研讨会论文集. 海口: 中国草学会, 2007: 163-165.

[3] 侯扶江, 南志标, 肖金玉, 常生华. 重牧退化草地的植被、土壤及其耦合特征. 应用生态学报, 2002, 13(8): 915-922.

[4] 卢虎, 姚拓, 李建宏, 马文彬, 柴晓虹. 高寒地区不同退化草地植被和土壤微生物特性及其相关性研究. 草业学报, 2015, 24(5): 34-43.

[5] 卢虎, 李显刚, 姚拓, 蒲小鹏. 高寒生态脆弱区"黑土滩"草地植被与土壤微生物数量特征研究. 草业学报, 2014, 23(5): 214-222.

[6] 张亮, 杨宇虹, 李倩, 吴叶宽, 黄建国. 自生固氮菌活化土壤无机磷研究. 生态学报, 2013, 33(7): 2157-2164.

[7] 张亮, 袁玲, 黄建国. 自生固氮菌对土壤钾的活化作用. 土壤学报, 2015, 52(2): 399-405.

[8] 苏大学, 张自和, 陈佐忠, 胡兴宗. GB 19377-2003 天然草地退化、沙化、盐渍化的分级指标. 北京: 中国标准出版社, 2004.

[9] 师尚礼. 草地工作技术指南. 北京: 金盾出版社, 2009.

[10] 姚拓, 龙瑞军, 师尚礼, 张德罡. 高寒草地不同扰动生境土壤微生物氮素生理群数量特征研究. 土壤学报, 2007, 44(1): 122-129.

[11] 吴小虎. 氟磺胺草醚对土壤微生物多样性的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.

[12] Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.

[13] Poly F, Monrozier L J, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. Research in Microbiology, 2001, 152(1): 95-103.

[14] 宋成军, 马克明, 傅伯杰, 曲来叶, 刘杨. 固氮类植物在陆地生态系统中的作用研究进展. 生态学报, 2009, 29(2): 869-877.

[15] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M, Steward G F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. Environmental Microbiology, 2003, 5(7): 539-554.

[16] 张晶, 张惠文, 李新宇, 苏振成, 张成刚. 土壤微生物生态过程与微生物功能基因多样性. 应用生态学报, 2006, 17(6): 1129-1132.

[17] 康文龙, 台喜生, 李师翁, 董康, 刘光琇, 张威. 祁连山高寒草原碱性土壤固氮微生物数量及固氮基因(*nifH*)群落结构研究. 冰川冻土, 2013, 35(1): 208-216.

[18] 谭红妍, 闫瑞瑞, 闫玉春, 陈宝瑞, 辛晓平. 不同放牧强度下温性草甸草原土壤生物性状及与地上植被的关系. 中国农业科学, 2014, 47(23): 4658-4667.

[19] 文都日乐, 张静妮, 李刚, 易津, 张永生, 杨殿林. 放牧干扰对贝加尔针茅草原土壤微生物与土壤酶活性的影响. 草地学报, 2010, 18(4): 517-522.

[20] 韩斌, 孔继君, 邹晓明, 巩合德. 生物固氮研究现状及展望. 山西农业科学, 2009, 37(10): 85-89.

[21] Wardle D A, Bardgett R D, Klironomos J N, Setälä H, van der Putten W H, Wall D H. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. Science, 2014, 304(5677): 1629-1633.

[22] Bardgett R D, Hobbs P J, Frostegård Å. Changes in soil fungal: bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. Biology and Fertility of Soils, 1996, 22(3): 261-264.

[23] Bardgett R D, Leemans D K, Cook R, Hobbs P J. Seasonality of soil biota of the grazed and ungrazed hill grasslands. Soil Biology and Biochemistry, 1997, 29(8): 1285-1294.

[24] Bardgett R D, Wardle D A, Yeates G W. Linking above-ground and below-ground interactions: how plant responses to foliar herbivory influence soil organisms. Soil Biology and Biochemistry, 1998, 30(14): 1867-1878.

[25] Grayston S J, Campbell C D, Bardgett R D, Mawdsley J L, Clegg C D, Ritz K, Griffiths B S, Rodwell J S, Edwards S J, Davies W J, Elston D J, Millard P. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. Applied Soil Ecology, 2014, 25(1): 63-84.

[26] Chabrerie O, Laval K, Puget R, Desaire S, Alard D. Relationship between plant and soil microbial communities along a successional gradient in a chalk grassland in north-western France. Applied Soil Ecology, 2013, 24(1): 43-56.

[27] Kowalchuk G A, Buma D S, de Boer W, Klinkhamer G L, van Veen J A. Effects of above- ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. Antonie van Leeuwenhoek, 2012, 81(1/4): 509-520.